

EFICIÊNCIA DE DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE MELOIDOGYNE SPP. NA CULTURA DA ACEROLEIRA

EFFICIENCY OF DIFFERENT MELOIDOGYNE SPP EXTRACTION METHODS. IN ACEROLEIRA CULTURE

Francisco Jorge Carlos de Souza Junior^{1*}, Mayara Castro Assunção², Arielena Augusta Rodrigues Mello³, Jaime Corbiniano Santos Neto³, Liany Regina Bezerra de Oliveira Silva³

¹Engenheiro Agrônomo pela UFC, Mestre em Fitopatologia pela UFRPE, Doutorando em Fitopatologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). jorgesouza@alu.ufc.br

²Engenheira Agrônoma pela UFAL, Mestre em proteção de plantas pela UFAL, Doutoranda em Fitopatologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

³Discentes do Curso de Agronomia na Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

Info

Recebido: 07/2020

Publicado: 12/2020

DOI: 10.29247/2358-260X.2020v7i2.4713

ISSN: 2358-260X

Palavras-Chave

Nematoides das galhas; Malpighia emarginata; Meloidogyne incognita; Meloidogyne enterolobii.

Keywords:

Root-knot Nematodes; Malpighia emarginata; Meloidogyne incognita; Meloidogyne enterolobii.

Abstract

The acerola plant is an important crop for northeastern Brazil, due to its adaptation to the region's climate. One of its main phytosanitary problems in the culture is the losses caused by phytomatotoids of the genus *Meloidogyne*, known as gall nematodes. In the various agronomic studies in the management of this disease in culture it is essential to isolate the pathogen to perform the study. In order to obtain suspension of phytomatoma inoculants, a fast, reliable and highly efficient method is necessary for the extraction of viable individuals from the soil and root system, both for field diagnostics, but also for laboratory research. The objective of the work was to evaluate different adaptations of the Jenkins method for soil samples and the Coolen and D'Harde method for root samples, regarding the amount of *M. incognita* and *M. enterolobii* extracted / mL, indicating which of these methodologies

can obtaining the largest amount of specimens and eggs extracted from the acerola culture. Therefore, the best extraction methodologies were the treatments using a rotation speed of 1400 rpm for soil samples and the treatment using the addition of kaolin for extractions of aceroleira roots in the two *Meloidogyne* species. For the extraction centrifugation time, each species has a different processing time.

Resumo

A aceroleira é uma importante cultura para região nordeste do Brasil, devido ao sua adaptação ao clima da região. Um dos seus principais problemas fitossanitários na cultura são as perdas ocasionadas por fitonematoides do gênero *Meloidogyne*, conhecido como nematoides das galhas. Nos diversos estudos agrônômicos no manejo desta doença na cultura é essencial o isolamento do patógeno para realizar de estudo. Para obtenção de suspensão de inóculo de fitonematoides é necessário um método rápido, confiável e altamente eficiente para a extração de indivíduos viáveis do solo e sistema radicular, tanto para diagnósticos de campo, mas também para pesquisas em laboratório. O objetivo do trabalho foi avaliar diferentes adaptações do método de Jenkins para amostras de solo e o método de Coolen e D'Harde para amostras de raízes, quanto à quantidade de *M. incognita* e *M. enterolobii* extraídos/mL, indicando qual destas metodologias pode-se obter a maior quantidade de espécimes e ovos extraídos da cultura da acerola. Portanto, as melhores metodologias de extração foram os tratamentos usando velocidade de rotação de 1400 rpm para amostras de solo e o tratamento utilizando a adição de caulim para extrações de raízes de aceroleira nas duas espécies de *Meloidogyne*. Para o tempo da centrifugação na extração, cada espécie tem um tempo de processamento diferente.

INTRODUÇÃO

A aceroleira (*Malpighia emarginata* D.C.) é uma planta pertencente à família Malpighiaceae, do gênero *Malpighia*, possui origem nas Ilhas do Caribe, América do Sul e América Central, é uma planta de pequeno a médio porte (Ritzinger e Ritzinger, 2011). A acerola é conhecida por ser fonte alimentar de vitamina C e também contém fitoquímicos, como carotenóides e polifenóis (Sousa et al., 2011). O Brasil é considerado um dos maiores produtores mundiais de acerola, com destaque para a região Nordeste que é responsável por produzir mais de 22.500 toneladas de frutos de acerola, principalmente nos Estados de Pernambuco, Sergipe, Ceará, Paraíba e Piauí, que são os maiores produtores de acerola no Brasil (IBGE, 2017; Kist et al., 2018).

A cultura da acerola é severamente atacada por diversas espécies de *Meloidogyne* Goeldi (1887), as perdas ocasionadas pelos fitonematoides na cultura são consideradas como um fator limitante na produção de acerola no Brasil (Cabrera e El-Borai, 2018). O gênero *Meloidogyne* pertencente à família Meloidoginidae, conhecido como nematoide das galhas, em razão da formação de galhas no sistema radicular parasitado por *Meloidogyne* spp., compreende o maior grupo de fitonematoides, responsável por causar perdas elevadas mundialmente, devido sua ampla gama de hospedeiros em diferentes culturas de interesses econômico (Freire et al., 2002). As principais espécies de *Meloidogyne* associada à aceroleira no Brasil são *M. incognita* Kofoid e White, 1919 e *M. enterolobii* Yang e Eisenback, 1983 (Rossiter et al., 2008).

Diversos parâmetros influenciam a extração dos fitonematoides e a seleção do melhor método a ser utilizado dependendo dos objetivos da extração. A forma e o tamanho do corpo do nematoide, o tipo de parasitismo, o estágio de desenvolvimento, a mobilidade, o tipo de substrato em que se encontra e as condições abióticas adversas às quais os nematoides

estão submetidos, são exemplos desses parâmetros (Sharma et al., 2002; Gomes et al., 2003). Variados são os métodos de extração de fitonematoides, podendo ser qualitativos ou quantitativos, sendo utilizados para a extração de fitonematoides de acordo com a estratégia de parasitismo do patógeno, além de metodologia especializada para os fitonematoides presentes em solo, sementes ou em partes da planta hospedeira (Ferraz e Brown, 2016).

O método mais utilizado para extração de fitonematoides do solo é o método de flotação centrífuga em solução de sacarose, conhecido como método de Jenkins (1964). É uma técnica bastante rápida que consegue separar os fitonematoides do solo por diferença de densidades específicas da água, do fitonematoide, da solução de sacarose e das partículas do solo. Um das vantagens da utilização desta técnica é a possibilidade de extração de fitonematoides vivos e mortos, logo é possível obter uma suspensão com grande quantidade de indivíduos nas extrações (Curran e Heng, 1992; Deng et al., 2008; Hooper et al., 2005). O método de Jenkins também é o mais utilizado nos laboratórios de fitonematologia, devido à alta eficiência, com a amostra final geralmente clara, fácil de ser trabalhada. Há ainda, as pequenas variações e adaptações utilizadas nesta metodologia, como diminuição no tempo de centrifugação ou aumento no número de rotações (Goulart, 2010; Machado et al., 2019; Souza et al., 2019; Tihohod, 2000).

Para análises de amostra de raízes infestadas por fitonematoides, o método de extração mais utilizado é o de Coolen e D'Harde (1972), devido sua eficiência e rapidez do procedimento, é bastante semelhante ao método de Jenkins, conseguindo extrair grande quantidade de fitonematoides em diferentes estádios (Oliveira et al., 2016; Santos, 2018).

O objetivo do trabalho foi avaliar diferentes adaptações do método de Jenkins para amostras de solo

e o método de Coolen e D'Harde para amostras de raízes, quanto à quantidade de *Meloidogyne* spp. extraídos/mL, indicando qual destas metodologias pode-se obter a maior quantidade de espécimes e ovos extraídos da cultura da acerola.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizadas coletas de solo (1 kg) e raízes (0,5 kg) em pomar de aceroleira (8°17'S; 34°56'36"O) no município de Recife, localizado na mesorregião Metropolitana do Estado de Pernambuco, em agosto de 2019. Posteriormente, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Fitonematologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco para extração.

As populações *Meloidogyne* spp. coletadas foram previamente identificadas, por meio da técnica da eletroforese com a isoenzima esterase, conforme Alfenas (2006). Foram selecionadas duas populações, uma de *M. incognita* (CN0007) e outra de *M. enterolobii* (CN0008) da Coleção Nematológica da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Após confirmação das espécies, as extrações de solo foram padronizadas para amostras de 300 cm³ de solo infestado com fitonematoides, onde foram homogêneas em água na proporção de 100 cm³ de solo em dois litros. Foram utilizadas peneiras de 60 mesh sobrepostas em outra de 400 mesh nos procedimentos de extração de solo, posteriormente foram utilizados três tratamentos em relação à rotação na etapa final da extração de Jenkins, adotando as seguintes rotações 1400 rpm, 1750 rpm e 2000 rpm em centrífuga, ambas por quatro minutos e cinco minutos em solução de sacarose.

Após os procedimentos, as suspensões foram avaliadas, por meio da contagem e identificação de ovos, juvenis de segundo estágio (J2) e adultos de *M. incognita* e *M. enterolobii*, com o auxílio de lâminas de

Peters sob microscópio óptico, utilizando-se a média de duas leituras.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial (dois fitonematoides: *M. incognita* (Mi) e *M. enterolobii* (Me), três rotações: 1400 (S1), 1750 (S2) e 2000 (S3) rpm e dois tempos: quatro (T1) e cinco minutos (T2)), empregaram-se com cinco repetições cada em cada tratamento.

Para as amostras de raízes de aceroleira, inicialmente lavou-se as raízes e cotou-se em fragmentos com o auxílio de uma tesoura. Retirou-se uma amostra de 10g de raiz por tratamento, depois com auxílio de liquidificador, o material é triturado com água em velocidade média por 30 segundos. Posteriormente, as suspensões são peneiras com o conjunto de duas peneiras, sendo uma de 60 mesh em cima de outra peneira de 400 mesh, logo após foi recolhido o material retido na peneira de 400 mesh com o auxílio de uma ducha com água para um recipiente de plástico etiquetado. Os materiais recolhidos foram submetidos a dois tratamentos, R1: com adição de caulim (argila branca) e R2: sem adição de caulim, a 1750 rpm em centrífuga durante 4 minutos, segundo o restante da metodologia descrita por Coolen e D'Harde.

Após as extrações, as suspensões recolhidas nas amostras de raízes de aceroleira foram avaliadas, por meio da contagem e identificação de ovos, juvenis de segundo estágio (J2) e adultos de *M. incognita* e *M. enterolobii*, com o auxílio de lâminas de Peters sob microscópio óptico, utilizando-se a média de duas leituras.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SISVAR v.3.1 (Ferreira, 2008). Os dados obtidos em cada tratamento utilizado foram submetidos à análise de variância. As médias serão comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da avaliação do efeito da rotação na extração de solos e raízes *M. incognita* e *M. enterolobii* associada aceroleira, podem ser observados no Quadro 1.

Em relação à avaliação do número de juvenis de segundo estágio (J2) e adultos no solo, o tratamento S1 na população de Mi obteve média de 1080 indivíduos dos estádios J2 e adultos por 300 cm³ de solo, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos, já em Me os valores médio foi de 980. O tratamento S2 obteve valor médio de 588 na população de Mi, uma perda de 45,55% indivíduos na amostra em relação ao tratamento S1, porém na população de Me esta queda foi superior a 53,57%, com valor médio de 455. No tratamento S3, o valor médio foi 660 na população de Mi, com redução de 38,80% nos números de indivíduos recuperados na amostra, em comparação com S1, já na população de Me apresentou média de 523, uma redução de 46,63%.

Para extração de ovos de solo, é observado que o tratamento S1 a média de ovos na população de Mi foi de 170 ovos por 300 cm³ de solo, já para a população Me a média foi de 75 ovos. No tratamento S2 foram registradas extrações médias de 86 ovos na população

de Mi, representando uma redução aproximadamente 49,41% em comparação ao tratamento S1, porém na população de Me a queda foi mais acentuada, chegando a 78,66% com média de 16 ovos. Em S3 foram registrado valores médios de 56 ovos recuperados nas amostras da população de Mi, correspondendo uma redução de 65,88, queda semelhante de 66,66% é registrada na população de Me, com média de 25 ovos por 300 cm³ de solo.

Os resultados indicaram que no tratamento S1 se obteve a maior quantidade de indivíduos e números de ovos das populações de *Meloidogyne incognita* e *M. enterolobii* em amostras de solo de *Malpighia emarginata*, diferindo estatisticamente do tratamento, conforme visto no Quadro 1. Segundo McSorley e Walter, (1991) um método de extração deve ser preciso na recuperação de uma alta proporção da população e deve ser igualmente eficiente para todas as espécies e estágios da vida. Logo a velocidade da rotação no tratamento S1, apresentou condições ideais para obtenção de isolados de *M. incognita* e *M. enterolobii*. em diferentes estágios, já que em S1 foi possível obter um pellet estável que resultado na maior extração de indivíduos, conforme é relatado por Van Bezooijen (2006).

Quadro 1. Comparação de médias do número de ovos, juvenis de segundo estágio (J2) e adultos de diferentes rotações usada em extrações de solo de *M. incognita* e *M. enterolobii* associada aceroleira no Estado de Pernambuco, Brasil.

Tratamentos	<i>M. incognita</i>		<i>M. enterolobii</i>	
	J2 + Adultos	Números de ovos	J2 + Adultos	Números de ovos
S1	1080aA	170bA	980aA	75cA
S2	588aB	86bB	455aB	16cB
S3	660aB	58bAB	523aB	25bAB

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade.

Comparando diferentes métodos de extração de nematoides, Yen et al. (1998) trabalhando com *Meloidogyne incognita* observou o métodos da flotação

centrífuga é superior em relação a quantidade de indivíduos recuperados em uma amostras de solo, mostrando que está técnica é a mais viável para

diferentes patossistemas, como visto em S1. Semelhantemente, El-Marzoki (2019) trabalhando *Meloidogyne* spp. observou que o método da flotação centrífuga é o método de extração mais eficiente, logo é importante a verificação da rotação adequada pra cada patossistema.

Como o método de extração de Jenkins (1964), é baseado na separação por diferença de densidades através da centrifugação (Costa et al., 2002). O tratamento S1 pode ser fundamentado que quanto maior o número de rotações, maior quantidade de nematoides podem ser decantados devido à alta força centrípeta exercida na centrifugação. A textura do solo também pode influenciar a extração (El-Marzoki, 2019), porém a textura das amostras dos tratamentos foi às mesmas.

No tratamento S1, os valores médios superiores de ovos se explica, pois a técnica, quando ajustada corretamente pode extrair todas as espécies e todas as fases da vida das raízes e partículas do solo, resultado semelhante é visto por Sarah e Boisseau (2008) em extrações na cultura da banana. Visto que em montagem de experimento com *Meloidogyne* spp, são necessários elevados números de ovos e juvenis de segundo estádios (Souza et al., 2019).

Os resultados da avaliação do efeito do Caulim na extração de raízes *M. incognita* e *M. enterolobii* associada aceroleira é visto no Quadro 2. O tratamento R1 apresentou valor médio de 560 indivíduos (de J2 + adultos) por 10g de raiz infestadas na população de Mi, já na população de Me o valor médio foi de 430. No tratamento R2 o valor médio registrado foi de 180 de J2 e adultos recuperados nas amostras, diferindo estatisticamente do tratamento R1, representando uma queda de 67,85% na recuperação dos fitonematoides da população de Mi nas amostras. Já na população Me, o tratamento R2 registrou acréscimo de 5,81% de indivíduos recuperados em relação ao tratamento R1, não diferindo estatisticamente do tratamento R1.

Em relação a número médio de ovos recuperados nas amostras de raízes, o tratamento R1 registrou valor médio de 684 ovos por 10g de raiz infestadas na população de Mi e média de 366 ovos na população de Me. No tratamento R2 foi observado valor médio de 360 ovos, diferindo estatisticamente do tratamento R1, correspondendo à redução 44,44% de ovos extraídos em comparação a R1. Na população Me, o tratamento R2 apresentou média de 313 ovos, não diferindo estatisticamente do tratamento R1, mostrando uma pequena queda de aproximadamente 14,48%.

Quadro 2. Comparação de médias do número de ovos, juvenis de segundo estágio (J2) e adultos em relação a adição e ausência de caulim usada em extrações de raízes de *M. incognita* e *M. enterolobii* associada aceroleira no Estado de Pernambuco, Brasil.

Tratamentos	<i>M. incognita</i>		<i>M. enterolobii</i>	
	J2 + Adultos	Números de ovos	J2 + Adultos	Números de ovos
R1	560aA	684aA	430aA	366bA
R2	180bB	380aB	455aA	313aA

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade.

Em amostras de raízes, o tratamento R1 apresentou maior valor médio, diferindo estatisticamente do tratamento R2 (Quadro 2),

indicando ser o tratamento mais apropriados para extração de fitonematoides no sistema radicular de *Malpighia emarginata*. Já que apenas em 10 g de raízes o

tratamento R2 obteve mais de três vezes o valor de ovos do que R1, logo para experimentação nematológica essa metodologia é mais apropriada para obtenção de inóculo (Hussey e Janssen, 2002).

A utilização do caulim influenciou em uma maior quantidade de nematoides/mL das amostras, o qual é explicado devido à alta densidade específica do caulim (2,6 g/cm³) (Biffi, 2002), fazendo com que ele seja decantado durante a centrifugação, colocando até os nematoides mais pesados em suspensão.

O efeito do tempo das centrifugações nas extrações são observado no Quadro 3. Nas extrações de J2 e adultos de amostras de solo são observados valores médios de 393 indivíduos por 300 cm³ de solo no tratamento T1 para população Mi, em T2 o valor é superior ao tratamento anterior, com média de 458, porém não diferem estatisticamente. Já o efeito do tempo na população Me, foi à obtenção de média de 730 indivíduos em T1, e 575 em T2, diferindo estatisticamente de T1, e mostrando uma redução de

21,23% em comparação ao tratamento T1. Para as extrações de J2 e adultos de amostras de raízes são registrados valor médio de 637 indivíduos por 10g de raiz infestadas da população Mi, na população Me o valor médio registrado foi de 835, diferindo estatisticamente do tratamento T1.

Na avaliação das contagens dos ovos nas amostras de solo foram registrados valores médios de 357 na população Mi e 450 na população Me, ambas no tratamento T1. Em T2 foi observado que o valor médio de ovos foi superior ao tratamento T1 nas duas populações estudadas, com média de 620 em Mi e 630 em Me, ambos diferindo estatisticamente do tratamento T1. Nas amostras de raízes, a média de ovos foram maiores em T2 para população Mi, com média de 735 ovos por 10g de raiz infestadas e T1 para população Me, com valor médio de 835 ovos, os dois tratamentos para cada população diferiram estatisticamente dos demais tratamentos.

Quadro 3. Comparação de médias do número de ovos, juvenis de segundo estágio (J2) e adultos em relação ao tempo da centrifugação nas extrações de raízes e solo de *M. incognita* e *M. enterolobii* associada aceroleira no Estado de Pernambuco, Brasil.

Tratamentos	<i>M. incognita</i>				<i>M. enterolobii</i>			
	Solo		Raiz		Solo		Raiz	
	J2 + Adultos	Números de ovos	J2 + Adultos	Números de ovos	J2 + Adultos	Números de ovos	J2 + Adultos	Números de ovos
T1	393cA	357cB	637bA	570aB	730aA	450cB	738aA	835aA
T2	458cA	620aA	798cA	735aA	575bB	630bA	635bB	535cB

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade.

O tempo da centrifugação nas extrações de nematoides é uma etapa essencial, devido ao cuidado para não inviabilizar a suspensão de inóculo (Gomes, 2018; Goulart, 2010). Neste trabalho foi observado que para obtenção de espécimes de diferentes estádios para *Meloidogyne incognita* na cultura da acerola o recomendado é o tempo de cinco minutos, porém para

M. enterolobii o tempo de quatro minutos é mais eficiente.

CONCLUSÕES

Como nenhum método de extração é 100% eficiente, cabe ao pesquisador obter uma estimativa da eficiência da extração. Portanto, as melhores

metodologias em relação a velocidade de rotação foi de 1400 rpm para extração de amostras de solo e de adição de caulim para extrações de raízes de *Malpighia emarginata*, respectivamente, no patossistema acerola x *Meloidogyne* spp. apresentaram-se mais eficazes na obtenção de fitonematoides deste gênero visando número elevado de espécimes de diferentes estádios.

Em relação ao tempo da centrifugação na extração, foi visto que para *Meloidogyne incognita* deve ser de cinco minutos e quatro minutos para *M. enterolobii*.

REFERÊNCIAS

- Biffi G. O grés porcelanato: manual de fabricação e técnicas de emprego. Rio Claro: Faenza Editrice do Brasil; 2002.
- Cabrera JA, El-Borai FE. Nematode Parasites of Subtropical and Tropical Fruit Tree Crops. In: Sikora RA, Coyne D, Hallmann J, Timper P. Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture. 3rd edition. Boston: CAB International; 2018. p.467-492.
- Coolen WA, D'Herde CJ. A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. Ghent: State Agriculture Research Centre; 1972.
- Costa DA, Otoboni CEM, Saraiva RF. Efeito de três Diferentes Condições de Armazenamento de Amostras de Campo para Análise Nematológica, sobre a Recuperação de Nematóides do Solo e Raízes pelas Metodologias de Baermann (1917), Jenkins (1964), Coolen & D'herde (1972). Revista Científica Eletrônica de Agronomia. 2002, 1(2): 1-5.
- Curran J, Heng J. Comparison of three methods of estimating the number of entomopathogenic nematodes present in soil samples. J. Nematol. 1992, 24: 170-176.
- Deng D, Zipf A, Tilahun Y, Sharma GC, Jenkins J, Lawrence, K. An improved method for the extraction of nematodes using iodixanol (OptiPrep). African Journal of Microbiology Research. 2008, 2(7): 167-170.
- El-Marzoki A. A Comparative Study of Three Widespread Methods for Extracting Plant-Parasitic Nematodes from Soil Samples. Egyptian Journal of Agronematology. 2019, 18(2): 81-89.
- Ferraz LCCB, Brown DJF. Nematologia de plantas: fundamentos e importância. Manaus: Norma Editora; 2016.
- Ferreira DF. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. Revista Symposium. 2008, 6(2): 36-41.
- Freire CR, Davide LC, Campos VP, Santos CD, Freire PW. Cromossomos de três espécies brasileiras de *Meloidogyne*. Ciência e Agrotecnologia, Lavras. 2002, 26(5): 900-903.
- Gomes FCC. Manual de Aulas Práticas de Nematologia Agrícola [Monografia]. Morrinhos: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano; 2018.
- Gomes GS, Huang SP, Cares JE. Nematode community, trophic structure and population fluctuation in soybean fields. Fitopatologia Brasileira. 2003, 28(3): 258-266.
- Goulart AMC. Análise nematológica: importância e princípios gerais. Planaltina: Embrapa Cerrados; 2010.
- Hopper DJ, Hallmann J, Subbotin SA. Methods of extraction, processing, and detection of plant soil nematodes. In: Luc M, Sikora AR, Bridge J. Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. 2 Eds. Wallingford: CAB International; 2005. p. 53-86.
- Hussey RS, Janssen GJW. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species. In: Starr JL, Cook R, Bridge J. Plant resistance to nematodes. Boston: CABI Publishing; 2002. p. 43-70.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção e área nos estabelecimentos agropecuários com mais de 50 pés existentes. Rio de Janeiro, RJ: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; 2017 [acesso em 10 mar 2020]. Disponível em: https://censos.ibge.gov.br/agro/2017/templat es/censo_agro/resultadosagro/agricultura.html ?localidade=0&tema=76215.

- Jenkins WRB. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant disease reporter*. 1964, 48: 692.
- Kist BB, Carvalho C, Treichel M, Santos CE. *Anuário Brasileiro Da Fruticultura* 2018. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz; 2018.
- Machado ACZ, Silva AS, Ferraz LCCB. *Métodos em nematologia agrícola*. Piracicaba: Sociedade Brasileira de Nematologia; 2019.
- McSorley R, Walter DE. Comparison of soil extraction methods for nematodes and microarthropods. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 1991, 34(1-4): 201-207.
- Oliveira CMG, Santos MA, Castro LHS. *Diagnose de Fitonematoides*. Campinas, SP: Millennium Editora; 2016.
- Rossiter JGA, Musser RS, Martins LSS, Pedrosa EMR, Medeiros JE. Seleção de genótipos de aceroleira assistida por marcadores isoenzimáticos visando à resistência a *Meloidogyne incognita* raça 2. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 2008, 30(4): 1057-1064.
- Santos TFS. Situação atual e prospecção de serviços prestados por laboratório de nematologia no Brasil. In: *Anais do 35º Congresso Brasileiro de Nematologia*; junho 2018; Bento Gonçalves. Brasília, DF: Embrapa; 2018. p. 41-42.
- Sarah JL, Boisseau M. Nematode extraction from banana roots by the centrifugal-flotation technique. *Fruits*. 2008, 63: 249-251.
- Sharma RD, Cavalcante MJB, De Mello, G. Nematoides associados a genótipos de soja cultivados no Acre, Brasil. *Nematologia Brasileira*. 2002, 26(1): 109-111.
- Sousa MSB, Vieira LM, Silva MJM, Lima A. Nutritional characterization and antioxidant compounds in pulp residues of tropical fruits. *Ciência e Agrotecnologia*. 2011, 35(3): 554-559.
- Souza DHG, Fujimoto JYH, Kuhn OJ, Lorenzetti E, Ritt AL, Faria VO. Métodos básicos para experimentação em Nematologia. In: *Zuffo AM. A Produção do Conhecimento nas Ciências Agrárias e Ambientais*. 4 Eds. Ponta Grossa: Atena Editora, 2019. p.41-53.
- Tihohod D. *Nematologia agrícola aplicada*. 2 ed. Jaboticabal: Fundação de Apoio a Pesquisa, Ensino e Extensão; 2000.
- Van Bezooijen J. *Methods and techniques for nematology*. Wageningen: Wageningen University; 2006.
- Yen JH, Lee MD, Chen DY, Lin CY, Tsay TT. The comparison of three nematode-extraction methods on four selected nematodes. *Plant Protection Bulletin*. 1998, 40: 153-162.